



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105158459 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 16

(21) 申请号 201510403831. 8

(22) 申请日 2015. 07. 10

(71) 申请人 南京师范大学

地址 210046 江苏省南京市亚东新城区文苑路1号

(72) 发明人 李建林 徐杰 李玮 杨滢 徐婧婧 沈鹏 刘蕊 郑铁松

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207 代理人 卢亚丽

(51) Int. Cl. G01N 33/535(2006. 01)

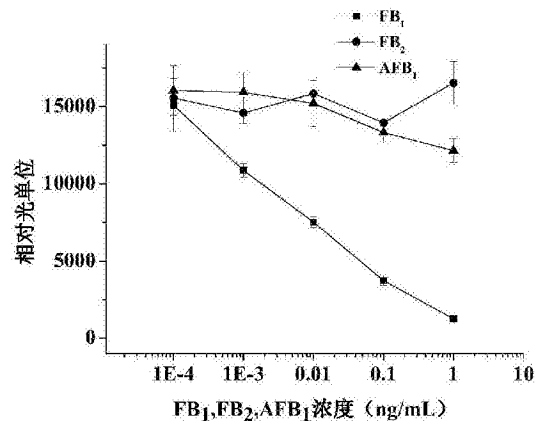
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种水凝胶二氧化硅光子晶体微球化学发光法高灵敏度、低背景检测伏马毒素 B1 的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种水凝胶二氧化硅光子晶体微球化学发光法高灵敏度检测伏马毒素 B1 的方法，该方法通过在二氧化硅光子晶体微球空隙紫外聚合凝胶，减小微球内部的多孔结构，减小非特异性生物反应的背景信号，提高检测灵敏度和准确度。以该微球表面为伏马毒素 B1 探针载体，在微球表面构建竞争化学发光免疫检测伏马毒素 B1 检测体系，利用多功能酶标仪对化学发光信号进行检测，该方法对伏马毒素 B1 的检测限为 0. 0001ng/mL，线性检测范围为 0. 0001 到 1ng/mL 之间，具有检测灵敏度高、背景信号低优点。



1. 一种用水凝胶二氧化硅光子晶体微球化学发光法检测伏马毒素 B1 的方法,其特征 在于,通过在二氧化硅光子晶体微球空隙紫外光照射下聚合凝胶,减小微球内部的多孔结 构;以该水凝胶二氧化硅光子晶体微球表面为伏马毒素 B1 探针载体,在微球表面构建竞争 化学发光免疫检测伏马毒素 B1 检测体系,利用多功能酶标仪对化学发光信号进行检测;

包括以下步骤:

(1) 水凝胶二氧化硅光子晶体微球的制备;

(2) 水凝胶二氧化硅光子晶体微球的修饰:通过体积比 3:7 的双氧水与浓硫酸对步骤 (1) 得到的微球表面进行羟基化修饰,再用  $\gamma$ -缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷对微球表面 进行环氧基修饰;

(3) 抗原的固定:通过化学键合方法将伏马毒素 B1 人工抗原固定于经过步骤 (2) 修饰 的微球表面;

(4) 用水凝胶二氧化硅光子晶体微球对待测样品进行竞争免疫检测;利用多功能酶标 仪检测化学发光信号值。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于步骤 (1) 通过两项流自组装技术制备二氧 化硅光子晶体微球;通过体积比 3:7 的双氧水与浓硫酸对二氧化硅光子晶体微球亲水性修 饰,水凝胶溶液的组成为丙烯酸:2-羟基-2-甲基-1-苯基-1-丙酮:聚乙二醇二丙烯酸酯: 水为 20:10:100:870(v/v),用玻璃棒搅拌充分混匀;将处理过的微球放入已配置好的水凝 胶溶液的烧杯中浸泡,并每 5 分钟摇晃一次,2 小时后将烧杯中的水凝胶溶液吸走,将烧杯 中放于磁力搅拌器上,加入甲基硅油没过转子,以 300rpm/min 的转速转动 2 小时,最后将分 散开的微球放于紫外灯下照射 10 秒钟,得到水凝胶二氧化硅光子晶体微球。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于所述伏马毒素 B1 人工抗原包被浓度为 1000ng/mL,抗体稀释比率为 1:30000,二抗稀释比率为 1:6000。

## 一种水凝胶二氧化硅光子晶体微球化学发光法高灵敏度、 低背景检测伏马毒素 B1 的方法

### 技术领域

[0001] 本发明设计农产品、饲料和食品中的伏马毒素高灵敏度、低背景、低成本检测技术方法。具体通过自组装技术和紫外聚合技术合成水凝胶二氧化硅光子晶体微球,以该光子晶体为载体,通过在该微球表面构建竞争免疫化学发光、高灵敏度、低背景、低成本检测伏马毒素新方法。

### 背景技术

[0002] 伏马毒素 (Fumonisin) 是由镰刀菌素属 (*Fusarium* genus) 的真菌产生的代谢物。伏马毒素污染范围广泛,在玉米及其制品中尤为明显。伏马毒素主要影响动物的肝脏及肾脏,长期或高剂量接触会诱发肝癌,并且对胚胎、肺、肌肉骨骼等也有不同程度的损伤,尤其是伏马毒素 B1 (FB1),能使人类和动物中毒、致癌。食品添加剂联合专家委员会 (JECFA) 第 56 次会议确立了一组关于伏马毒素的每日最大容许摄入量 (PMTDI),规定伏马毒素 B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>),伏马毒素 B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) 和伏马毒素 B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>) 单独或者混合的每日最大容许摄入量不超过 2 μg/kg。高灵敏度、低成本的检测技术方法是预防农产品、食品、饲料中伏马毒素污染和食品安全评估的最有效手段之一。目前常用的伏马毒素检测方法有色谱法、免疫分析法等。但是,色谱技术方法需要昂贵的检测设备,专门的仪器操作技术人员,检测成本高,很难在食品安全生产、销售一线推广和普及;免疫学技术虽然简单易行,但是该技术对有些真菌毒素检测的灵敏度不够,而且检测需要消耗大量的抗体试剂;基于多孔表面免疫方法检测真菌毒素如光子晶体微球液相芯片化学发光方法,由于其检测背景信号高,检测限有限,准确度较差。研究和开发一种新型的高灵敏度、低背景信号、低成本、特异性好的检测技术和方法具有重要的现实意义。

### 发明内容

[0003] 本发明提供一种农产品、饲料和食品中的伏马毒素高灵敏度、低背景、低成本检测技术方法。具体通过自组装技术和紫外聚合技术合成水凝胶二氧化硅光子晶体微球,以该光子晶体为载体,通过在该微球表面构建竞争免疫化学发光、高灵敏度、低背景、低成本检测伏马毒素新方法。

[0004] 本发明微球的制备:将制备的 SiO<sub>2</sub> 三维光子晶体微球用食人鱼洗液浸泡 2 小时,增强其表面的亲水性,使得水凝胶液更易填满微球内部。将处理过的微球放入已配置好的水凝胶溶液的烧杯中浸泡,并每 5 分钟摇晃一次,以保证 SiO<sub>2</sub> 光子晶体微球与水凝胶溶液充分接触,2 小时后将烧杯中的水凝胶溶液吸走,将烧杯中放于磁力搅拌器上,加甲基硅油没过转子,以 300rpm/min 的转速转动 2 小时,此时微球已经完全分散开。最后将分散开的微球放于紫外灯下照射 10 秒钟,得到水凝胶液固定。得到的水凝胶 SiO<sub>2</sub> 光子晶体微球和 SiO<sub>2</sub> 光子晶体微球表面结构对照如图 1。

[0005] 在制备的水凝胶 SiO<sub>2</sub> 光子晶体微球表面修饰 γ-缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷

(GPTMS) 环氧基, 固定伏马毒素 B1 包被抗原, 牛血清蛋白 (BSA) 封闭。在水凝胶  $\text{SiO}_2$  光子晶体微球表面构建竞争免疫化学发光、高灵敏度、低背景、低成本检测伏马毒素新方法。以辣根过氧化物酶标记的二抗与伏马毒素 B1 抗体特异性结合, 加入鲁米诺、双氧水化学发光底物后, 用多功能酶标仪检测化学发光信号值强弱。建立标准曲线和检测食品中的伏马毒素 B1。

[0006] 上述方法包括以下步骤:

[0007] (1) 水凝胶  $\text{SiO}_2$  光子晶体微球的制备

[0008] (2) 水凝胶溶液的配制方法: 向烧杯中依次添加 870 微升的双蒸水、丙烯酸 20 微升、2-羟基-2-甲基-1-苯基-1-丙酮 10 微升、聚乙二醇二丙烯酸酯 100 微升, 用玻璃棒搅拌充分混匀。(3) 水凝胶光子晶体微球表面的修饰: 通过体积比 3:7 的双氧水与浓硫酸对步骤 (1) 得到的微球表面进行羟基化修饰, 再用  $\gamma$ -缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷 (GPTMS) 对微球表面进行环氧基修饰;

[0009] (4) 抗原的固定: 通过化学键合的方法将伏马毒素 B1 人工抗原 (FB1-BSA) 固定于经步骤 (2) 表面修饰的微球表面。

[0010] (5) 用水凝胶光子晶体微球对待测样品进行竞争免疫检测, 利用标记有辣根过氧化物酶的二抗与伏马毒素 B1 抗体进行特异性反应, 加入化学发光底物后, 用酶标仪对发光信号强度进行检测。

[0011] 谷物试样的处理:

[0012] 大米、玉米和小麦使用中药粉碎机粉碎, 过 20 目筛, 称取试样各 5g 于 100mL 的三角瓶中, 向样品中添加不同浓度及体积的伏马毒素 B1 标准品, 充分混合试样后, 将其放入通风处内, 直至溶剂蒸发完全。向其中加入提取剂 (甲醇:水 = 6:4) 15mL, 在摇床内 150r/min, 提取 2 小时, 用 whatman 滤纸过滤, 滤液即为待测样品。

[0013] 竞争免疫检测:

[0014] 将修饰后的微球至于离心管中, 每管 5 球, 后加入 10  $\mu\text{L}$  浓度为 1000ng/mL 的伏马毒素 B1-牛血清蛋白偶联物 (FB1-BSA), 4 $^{\circ}\text{C}$  下过夜。后用 PBST 和 PBS 各清洗微球 3 次, 后向离心管中加入 10  $\mu\text{L}$  含有 1% 牛血清蛋白 (BSA) 的 pH = 9.6 的碳酸盐缓冲液, 对微球表面上未结合抗原的活性基团进行封闭, 室温下封闭 1 小时, 后用 PBST 和 PBS 各清洗微球 3 次。向各离心管中依次加入 10  $\mu\text{L}$  不同浓度梯度的伏马毒素 B1 标准溶液或提取的谷物试样, 接着再向离心管中加入 10  $\mu\text{L}$  的伏马毒素 B1 抗体 (FB1-Ab), 37 $^{\circ}\text{C}$  下竞争结合 1.5 小时, 用 PBST 和 PBS 各清洗微球 3 次后, 向离心管中加入 10  $\mu\text{L}$  的稀释比率为 1:6000 的辣根过氧化物酶标记的二抗 (HRP-IgG), 37 $^{\circ}\text{C}$  下反应 1 小时, 用 PBST 和 PBS 各清洗微球 3 次。将微球移入 384 黑色微孔板中, 每孔加入化学发光底物液 (双氧水、鲁米诺和对碘苯酚混合物) 20  $\mu\text{L}$ , 用多功能酶标仪检测各孔化学发光强度, 积分时间 1s。伏马毒素 B1 的标准曲线见图 2。

[0015] 本发明首先采用改进 Stöber 法合成了单分散纳米二氧化硅微球, 通过二氧化硅颗粒自组装技术, 组装成结构和均一的光子晶体微球。将光子晶体微球放在蒸馏水中用超声波洗净后将其浸入食人鱼洗液 (浓硫酸:双氧水 = 7:3) 进行清洗, 使其表面硅羟基增多, 将处理过的微球放入已配置好的水凝胶溶液的烧杯中浸泡, 并每 5 分钟摇晃一次, 以保证  $\text{SiO}_2$  光子晶体微球与水凝胶溶液充分接触, 2 小时后将烧杯中的水凝胶溶液吸走, 将烧杯中

放于磁力搅拌器上,加甲基硅油没过转子,以 300rpm/min 的转速转动 2 小时,此时微球已经完全分散开。最后将分散开的微球放于紫外灯下照射 10 秒钟,得到水凝胶液固定。利用 1%的  $\gamma$ -缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷 (GPTMS) 甲苯溶液浸泡,使其表面修饰环氧基。通过优化包被 pH 值及化学发光底物反应时间,伏马毒素 B1 抗原浓度,伏马毒素 B1 抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗稀释比率,确定了最佳包被 pH 值为 9.6,包被浓度为 1000ng/mL,抗体稀释比率分别为 1:30000 和 1:6000,化学发光底物反应时间为 5min。

[0016] 利用水凝胶光子晶体微球具有较大的表面积,内部孔结构填充水凝胶的特点,不但能有效固定大量的靶分子探针,而且能够避免非特异吸附造成的背景信号高的特点。该技术建立的方法检测标准曲线和同粒径下  $\text{SiO}_2$ 光子晶体微球、玻璃微球标准曲线比较见图 3,很明显, $\text{SiO}_2$ 光子晶体微球具有很高的检测背景信号,表现在该 FB1 标准曲线下  $\text{IC}_{50}$ 值比水凝胶  $\text{SiO}_2$ 光子晶体微球高一个数量级,线性范围也少一个数量级,玻璃微球的 FB1 标准曲线下  $\text{IC}_{50}$ 值也低于水凝胶  $\text{SiO}_2$ 光子晶体微球的  $\text{IC}_{50}$ 值,检测线性范围仅仅 1 个数量级。建立水凝胶光子晶体微球对伏马毒素 B1 检测范围在 1-0.0001ng/mL 之间,对伏马毒素 B1 在大米、玉米和小麦中的回收率在 78.60%~107.59%之间。结构类似的毒素之间无干扰,具有良好的特异性。特异性见图 4。

[0017] 本发明中通过对反应条件进行优化,将化学发光信号值提高,从而扩大检测线性范围,降低了检测背景信号。这一技术对伏马毒素 B1 的检测灵敏度达到了 pg/mL,检测现行范围到 5 个数量级,结构类似的毒素之间不存在明显的干扰问题,具有良好的检测特异性。而且,检测样品试剂仅仅需要 2  $\mu\text{L}$ /球,节省了试剂和样品,将包被封闭好的微球直接用于检测,检测时间小于 3 小时。该技术可以高通量、快速、灵敏、稳定地检测样本,成本低廉。

#### 附图说明

[0018] 图 1  $\text{SiO}_2$ 光子晶体微球 (A),水凝胶  $\text{SiO}_2$ 光子晶体微球 (B) 表面结构

[0019] 图 2 伏马毒素 B1 检测标准曲线。

[0020] 图 3 同粒径的  $\text{SiO}_2$ 光子晶体微球 (A)、玻璃微球 (B) 检测伏马毒素 B1 检测标准曲线比较。图 4 伏马毒素 B1 检测的特异性。

#### 具体实施方式

[0021] 本发明所用伏马毒素 B1 标准品 (AFB1),伏马毒素 B1-牛血清蛋白偶联物 (AFB1-BSA),四氧乙基硅烷 (TEOS) 购于 Sigma-Aldrich。牛血清蛋白 (BSA),磷酸盐缓冲液 (PBS),鲁米诺购于上海生工有限公司。辣根过氧化物酶标记的二抗 (HRP-IgG),伏马毒素 B1 抗体 (AFB1-Ab) 购于 Abcam。 $\gamma$ -缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷 (GPTMS) 购于东京化成工业株式会社。甲基硅油购于宇诺公司。氨水、无水乙醇、吐温-20 购于南京化学试剂公司。谷物包括大米、玉米和小麦,购于南京热河南路农贸市场。

[0022] 本发明所用的仪器主要有:

[0023] AM-3250B 型磁力搅拌器天津奥特赛恩斯仪器有限公司

[0024] TDZ5-WS 型台式低速自动平衡离心机长沙湘智离心机仪器有限公司

[0025] KQ-300B 型超声波清洗器昆山市超声仪器有限公司

[0026] H600-II 型透射电子显微镜日本日立公司

- [0027] DHG-9140 型电热恒温鼓风干燥箱上海精宏实验设备有限公司
- [0028] OTL1200 管式炉南京南大仪器厂
- [0029] LSP01-1A 微流注射泵河北保定兰格恒流泵有限公司
- [0030] PHS-3C-01 型 pH 计上海三信仪表厂
- [0031] Infinite 200 多功能酶标仪帝肯(上海)贸易有限公司
- [0032] ZQTY-70-T 型震荡培养箱上海知楚仪器有限公司摇床
- [0033] 中药粉碎机长沙市常宏制药机械设备厂
- [0034] SW-CJ-2 净化工作台苏州净化仪器有限公司
- [0035] QL-866 漩涡混合仪海门麒麟医用仪器厂
- [0036] 单分散二氧化硅纳米颗粒的制备:采用改进Stöber法合成。

[0037] 实施例 1

[0038] 大米、玉米和小麦使用中药粉碎机粉碎,过 20 目筛,称取试样各 5g 于 100mL 的三角瓶中,向样品中添加不同浓度及体积的伏马毒素 B1 标准品,充分混合试样后,将其放入通风处内,直至溶剂蒸发完全。向其中加入提取剂(甲醇:水=6:4)15mL,在摇床内 150r/min,提取 2 小时,用 whatman 滤纸过滤,滤液即为待测样品。同时,按照上述方法提取没有加入标准品的对照试样。

[0039] 竞争免疫检测:

[0040] 将修饰后的微球至于离心管中,每管 5 球,后加入 10  $\mu$ L 浓度为 1200ng/mL 的伏马毒素 B1-牛血清蛋白偶联物(FB1-BSA),4 $^{\circ}$ C 下过夜。后用 PBST 和 PBS 各清洗微球 3 次,后向离心管中加入 10  $\mu$ L 含有 1%牛血清蛋白(BSA)的 pH = 9.6 的碳酸盐缓冲液,对微球表面上未结合抗原的活性基团进行封闭,室温下封闭 1 小时,后用 PBST 和 PBS 各清洗微球 3 次。向各离心管中依次加入 10  $\mu$ L 不同浓度梯度的伏马毒素 B1 标准溶液(标准曲线)或提取的谷物试样,接着再向离心管中加入 10  $\mu$ L 的伏马毒素 B1 抗体(FB1-Ab),37 $^{\circ}$ C 下竞争结合 1.5 小时,用 PBST 和 PBS 各清洗微球 3 次后,向离心管中加入 10  $\mu$ L 的稀释比率为 1:6000 的辣根过氧化物酶标记的二抗(HRP-IgG),37 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时,用 PBST 和 PBS 各清洗微球 3 次。将微球移入 384 黑色微孔板中,每孔加入化学发光底物液(双氧水、鲁米诺和对碘苯酚混合物)20  $\mu$ L,用酶标仪检测各孔化学发光强度,积分时间 1s。

[0041] 检测结果见表 1:

[0042] 表 1

[0043]

	加标浓度(ng/g)	回收率 (%)
大米	0.001	92.30±4.70
	0.01	107.53±12.32
	0.05	93.07±5.68
	0.1	107.59±8.07
	1	98.87±4.15
玉米	0.001	78.91±11.20
	0.01	79.75±13.32
	0.05	91.43±5.28
	0.1	89.18±8.37
	1	99.70±0.42
小麦	0.001	95.16±11.23
	0.01	128.45±6.34
	0.05	78.60±0.71
	0.1	85.28±7.05
	1	86.00±6.10

o.

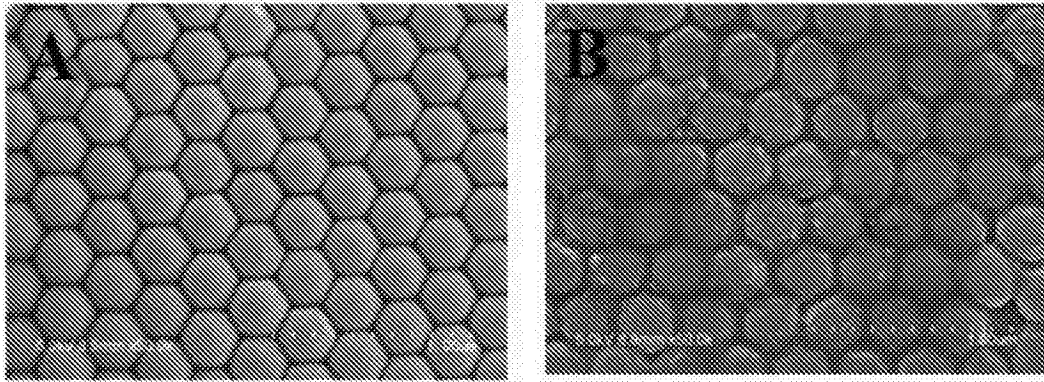


图 1

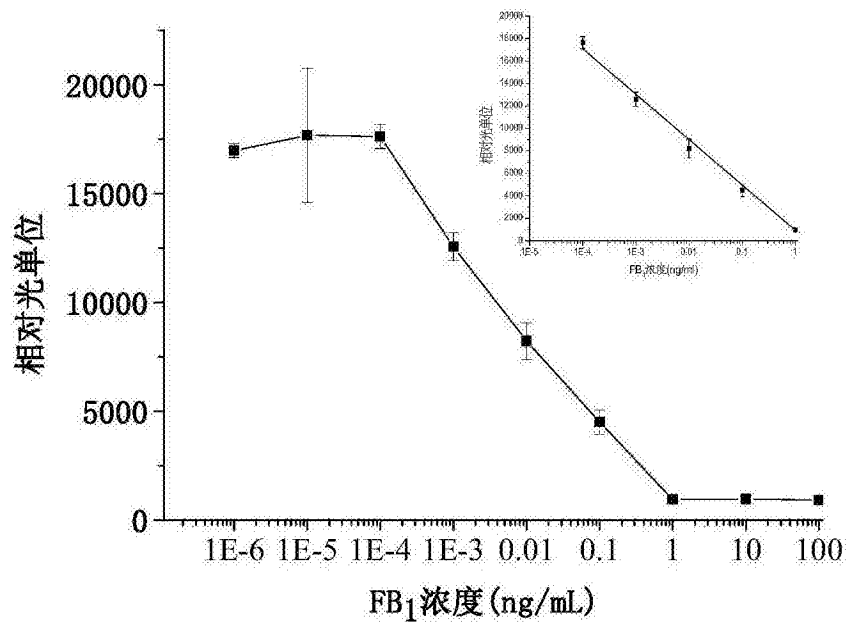


图 2

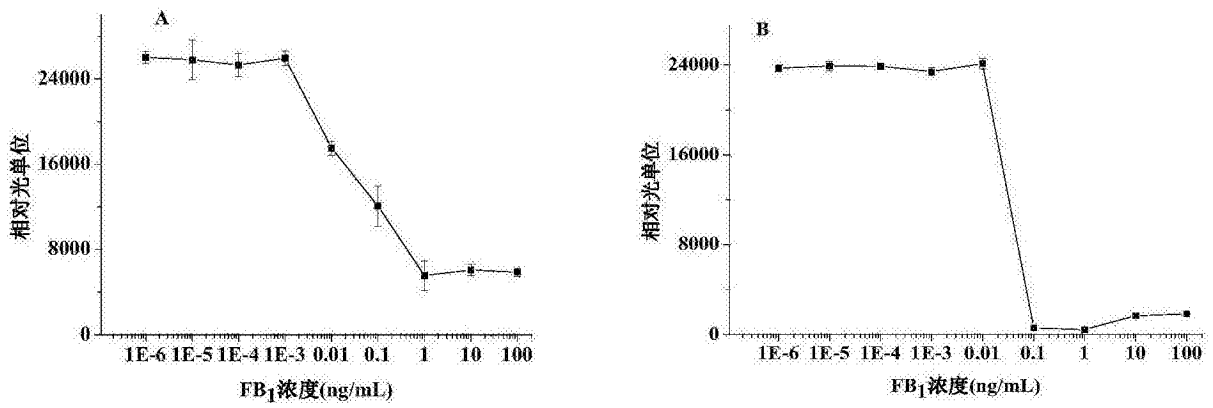


图 3

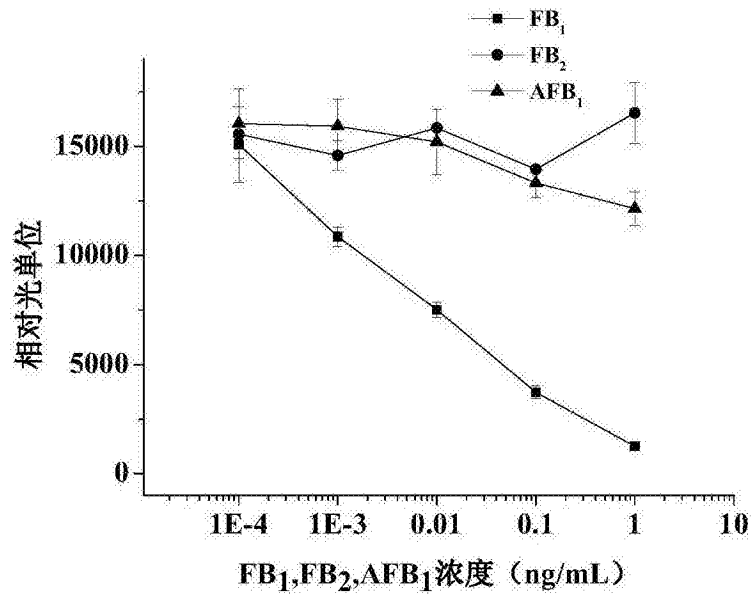


图 4

专利名称(译)	一种水凝胶二氧化硅光子晶体微球化学发光法高灵敏度、低背景检测伏马毒素B1的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105158459A</a>	公开(公告)日	2015-12-16
申请号	CN201510403831.8	申请日	2015-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
[标]发明人	李建林 徐杰 李玮 杨滢 徐婧婧 沈鹏 刘蕊 郑铁松		
发明人	李建林 徐杰 李玮 杨滢 徐婧婧 沈鹏 刘蕊 郑铁松		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	卢亚丽		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种水凝胶二氧化硅光子晶体微球化学发光法高灵敏度检测伏马毒素B1的方法，该方法通过在二氧化硅光子晶体微球空隙紫外聚合凝胶，减小微球内部的多孔结构，减小非特异性生物反应的背景信号，提高检测灵敏度和准确度。以该微球表面为伏马毒素B1探针载体，在微球表面构建竞争化学发光免疫检测伏马毒素B1检测体系，利用多功能酶标仪对化学发光信号进行检测，该方法对伏马毒素B1的检测限为0.0001 ng/mL，线性检测范围为0.0001到1ng/mL之间，具有检测灵敏度高、背景信号低优点。

